

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
9 August 2001 (09.08.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/57217 A1

(51) International Patent Classification⁷: C12N 15/21

(21) International Application Number: PCT/KR01/00097

(22) International Filing Date: 19 January 2001 (19.01.2001)

(25) Filing Language: Korean

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
2000-2434 19 January 2000 (19.01.2000) KR

(71) Applicant (for all designated States except US): HANMI
PHARM. CO. LTD. [KR/KR]; #893-5, Hajeo-ri, Paltan-
myeon, Hwaseong-gun, Kyungki-do 445-910 (KR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): KWON, Se,
Chang [KR/KR]; 5-201 Hanyang Apt., #789, Shi-
hung-1-dong, Guro-gu, Seoul 153-031 (KR).
JUNG, Sung, Youb [KR/KR]; 504-1402 Geoyeo Apt.,
#294, Geoyeo-2-dong, Songpa-gu, Seoul 138-112 (KR).
CHOI, Ki, Doo [KR/KR]; 601-407 Gaepo Jugong

Apt., Gaepo-3-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-243 (KR).
KIM, Cha, Soon [KR/KR]; 106-903 Poonglim Apt.,
#664, Poongdukcheon-lee, Suji-eup, Yongin-shi, Gy-
onggi-do 449-840 (KR). BAE, Sung, Min [KR/KR]; 303,
#1587-8, Bongcheon-4-dong, Kwanak-gu, Seoul 151-054
(KR). LEE, Gwan, Sun [KR/KR]; 2-806 Kukdong Apt.,
Garak-dong, Songpa-gu, Seoul 138-160 (KR).

(74) Agents: JANG, Seong, Ku et al.; First Law Offices of Ko-
rea, 17th Fl., KEC Building, #275-7, Yangjae-dong, Seo-
cho-ku, Seoul 137-130 (KR).

(81) Designated States (national): AU, BR, CA, CN, JP, NZ,
RU, SG, US.

(84) Designated States (regional): European patent (AT, BE,
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

Published:

— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: EXPRESSION AND SECRETION VECTOR FOR HUMAN INTERFERON ALPHA AND PROCESS FOR PRODUC-
ING HUMAN INTERFERON ALPHA BY EMPLOYING SAME

1 2 3



← Interferon α

(57) Abstract: Disclosed in this invention are: an expression vector for the secre-
tive production of human interferon alpha (hIFNα) comprising a polynucleotide
encoding a modified *E. coli* thermostable enterotoxin II signal sequence and a
polynucleotide encoding hIFNα ligated to the 3'-end thereof; a microorganism
transformed with the expression vector; and a process for secretively producing
human interferon by culturing the microorganism, said process being capable of
secreting a soluble form of active hIFNα, which does not contain an additional
methionine residue at its N-terminal, into the periplasm of an *E. coli* cell.



WO 01/57217 A1

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003-521925

(P2003-521925A)

(43)公表日 平成15年7月22日(2003.7.22)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード*(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 1/21	4 B 0 2 4
1/21		C 1 2 P 21/02	F 4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/02		C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 6 5

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 48 頁)

(21)出願番号 特願2001-558031(P2001-558031)
(86)(22)出願日 平成13年1月19日(2001.1.19)
(85)翻訳文提出日 平成14年7月19日(2002.7.19)
(86)国際出願番号 P C T / K R 0 1 / 0 0 0 9 7
(87)国際公開番号 W O 0 1 / 0 5 7 2 1 7
(87)国際公開日 平成13年8月9日(2001.8.9)
(31)優先権主張番号 2 0 0 0 - 2 4 3 4
(32)優先日 平成12年1月19日(2000.1.19)
(33)優先権主張国 韓国 (K R)
(81)指定国 E P (A T, B E, C H, C Y, D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E, T R), A U, B R, C A, C N, J P, N Z, R U, S G, U S

(71)出願人 ハンミ ファーム, シーオー, エル
ティーディー,
大韓民国 キョンギド ファソングン パ
ルタンミョン ハゾリ 893-5
(72)発明者 クウォン・セチャン
大韓民国153-031ソウル、グムチョング、
シフン1ドン・ナンバー789番、ハンヤ
ン・アパートメント5-201
(72)発明者 ジュン・スンヨウブ
大韓民国138-112ソウル、ソンバグ、ゴヨ
2ドン・ナンバー294番、ゴヨ・アパート
メント504-1402
(74)代理人 弁理士 青山 稔 (外3名)

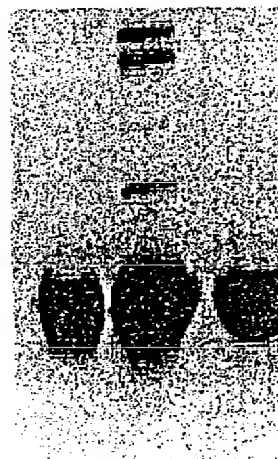
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒトインターフェロンアルファの発現分泌ベクターおよびそれを用いたヒトインターフェロンアルファの生産方法

(57)【要約】

大腸菌の変形された熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列をコードするポリヌクレオチドおよびその3'-末端に連結された、ヒトインターフェロンアルファ(human Interferon α : hIFN α)をコードするポリヌクレオチドを含むヒトインターフェロン α の発現生産用発現ベクター、前記発現ベクターで形質転換された細胞株、および前記細胞株を培養することによりアミノ末端に追加のメチオニンが添加されていないインターフェロン α を大腸菌菌体ペリプラズムに分泌させて大量生産する方法に関する。

1 2 3



←インターフェロン α

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：3のアミノ酸配列を有する大腸菌の熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列の4、20および22番目アミノ酸のうち一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換された変形された熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列をコードするポリヌクレオチドおよびその3'末端に連結されたヒトインターフェロン α (hIFN α)をコードするポリヌクレオチドを含むヒトインターフェロン α の分泌生産用発現ベクター。

【請求項2】 変形された熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列が下記群から選ばれることを特徴とする請求項1記載の発現ベクター：

配列番号：3のアミノ酸配列のうち4番アスパラギンがトレオニンに置換されたもの、

配列番号：3のアミノ酸配列のうち4番アスパラギンおよび22番チロシンが各々トレオニンおよびグルタミンに置換されたもの、

配列番号：3のアミノ酸配列のうち4番および20番アスパラギンが各々トレオニンおよびバリンに置換されたもの、

配列番号：3のアミノ酸配列のうち4番アスパラギン、20番アスパラギンおよび22番チロシンが各々トレオニン、バリンおよびグルタミンに置換されたもの。

【請求項3】 hIFN α をコードするポリヌクレオチドが配列番号：1のIFN α -2aまたは配列番号：2のIFN α -2bをコードすることを特徴とする請求項1記載の発現ベクター。

【請求項4】 変形された熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列をコードするポリヌクレオチドの5'末端前に大腸菌の熱安定性エンテロトキシンIIのシャイン-ダルガーノ配列 (SD sequence, 配列番号：8) またはその変形体をさらに含むことを特徴とする請求項1記載の発現ベクター。

【請求項5】 前記変形体は、配列番号：8の配列において5'末端のG A G G以降に1個または2個のヌクレオチドが欠損されたものであることを特徴とする請求項4記載の発現ベクター。

【請求項6】 S D配列の変形体が配列番号：9のヌクレオチド配列を有す

ることを特徴とする請求項 4 記載の発現ベクター。

【請求項 7】 ベクター pT14SSI α -2a-4T、pT140SSI α -2a-4T、pT14SSI α -2a-4T22Q、pT140SSI α -2a-4T22Q、pT140SSI α -2a-4T20V22Q、pT14NSSI α -2a-4T22Q、pT14MSSI α -2a-4T22Q、pT14SSI α -2b-4T、pT140SSI α -2b-4T、pT140SSI α -2b-4T22Q および pT140SSI α -2a-4T20V22Q からなる群から選ばれることを特徴とする請求項 1 記載の発現ベクター。

【請求項 8】 請求項 1 ～ 7 のいずれか一項の発現ベクターで形質転換された微生物。

【請求項 9】 大腸菌であることを特徴とする請求項 8 記載の微生物。

【請求項 10】 大腸菌 BL21 (DE3)/pT14SSI α -2a-4T (HM 10602)、大腸菌 BL21 (DE3)/pT140SSI α -2a-4T (HM 10603；寄託番号：KCCM-10175)、大腸菌 BL21 (DE3)/pT14SSI α -2a-4T22Q (HM 10604)、大腸菌 BL21 (DE3)/pT140SSI α -2a-4T22Q (HM 10611；寄託番号：KCCM-10176)、大腸菌 BL21 (DE3)/pT140SSI α -2a-4T20V22Q (HM 10612)、大腸菌 BL21 (DE3)/pT14NSSI α -2a-4T22Q (HM 10613)、大腸菌 BL21 (DE3)/pT14MSSI α -2a-4T22Q (HM 10614)、大腸菌 BL21 (DE3)/pT14SSI α -2b-4T (HM 10702)、大腸菌 BL21 (DE3)/pT140SSI α -2b-4T (HM 10703；寄託番号：KCCM-10177)、大腸菌 BL21 (DE3)/pT140SSI α -2b-4T22Q (HM 10711；寄託番号：KCCM-10178)、および大腸菌 BL21 (DE3)/pT140SSI α -2b-4T20V22Q (HM 10712) からなる群から選ばれることを特徴とする請求項 9 記載の微生物。

【請求項 11】 配列番号：3 のアミノ酸配列を有する大腸菌の熱安定性エンテロトキシン II シグナル配列の 4、20 および 22 番目アミノ酸のうち一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換された変形された熱安定性エンテロトキシン II シグナル配列をコードするポリヌクレオチドおよびその 3' 末端に連結された hIFN α をコードするポリヌクレオチドを含む hIFN α の分泌生産用発現ベクターで微生物を形質転換し、形質転換された微生物を適切な条件下で培養することによりアミノ末端にメチオニンが添加されていない活性 hIFN α を分泌生産する方法。

【請求項 12】 変形された熱安定性エンテロトキシン II シグナル配列が下記群から選ばれることを特徴とする請求項 11 記載の方法：

配列番号：3のアミノ酸配列のうち4番アスパラギンがトレオニンに置換されたもの、

配列番号：3のアミノ酸配列のうち4番アスパラギンおよび22番チロシンが各々トレオニンおよびグルタミンに置換されたもの、

配列番号：3のアミノ酸配列のうち4番および20番アスパラギンが各々トレオニンおよびバリンに置換されたもの、

配列番号：3のアミノ酸配列のうち4番アスパラギン、20番アスパラギンおよび22番チロシンが各々トレオニン、バリンおよびグルタミンに置換されたもの。

【請求項13】 hIFN α をコードするポリヌクレオチドが配列番号：1のIFN α -2aまたは配列番号：2のIFN α -2bをコードすることを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項14】 前記発現ベクターは、変形された熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列をコードするポリヌクレオチドの5'末端前に大腸菌の熱安定性エンテロトキシンIIのシャインーダルガーノ配列(SD sequence, 配列番号：8)またはその変形体をさらに含むことを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項15】 前記変形体は、配列番号：8の配列において5'末端のGAGG以降に1個または2個のヌクレオチドが欠損されたものであることを特徴とする請求項14記載の発現ベクター。

【請求項16】 SD配列の変形体が配列番号：9の配列を有することを特徴とする請求項14記載の発現ベクター。

【請求項17】 前記発現ベクターがベクターpT14SSI α -2a-4T、pT140SSI α -2a-4T、pT14SSI α -2a-4T22Q、pT140SSI α -2a-4T22Q、pT140SSI α -2a-4T20V22Q、pT14NSSI α -2a-4T22Q、pT14MSSI α -2a-4T22Q、pT14SSI α -2b-4T、pT140SSI α -2b-4T、pT140SSI α -2b-4T22QおよびpT140SSI α -2a-4T20V22Qからなる群から選ばれることを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項18】 前記形質転換された微生物が大腸菌BL21(DE3)/pT14SSI α -2a-4T(HM 10602)、大腸菌BL21(DE3)/pT140SSI α -2a-4T(HM 10603; 寄託番号：KCCM-10175)、大腸菌BL21(DE3)/pT14SSI α -2a-4T22Q(HM 10604)、大腸菌BL21(DE3

) / pT140SSI α -2a-4T22Q (HM 10611 ; 寄託番号 : KCCM-10176)、大腸菌BL21 (DE3) / pT140SSI α -2a-4T20V22Q (HM 10612)、大腸菌BL21 (DE3) / pT14NSSI α -2a-4T22Q (HM 10613)、大腸菌BL21 (DE3) / pT14MSSI α -2a-4T22Q (HM 10614)、大腸菌BL21 (DE3) / pT14SSI α -2b-4T (HM 10702)、大腸菌BL21 (DE3) / pT140SSI α -2b-4T (HM 10703 ; 寄託番号 : KCCM-10177)、大腸菌BL21 (DE3) / pT140SSI α -2b-4T22Q (HM 10711 ; 寄託番号 : KCCM-10178)、および大腸菌BL21 (DE3) / pT140SSI α -2b-4T20V22Q (HM 10712) からなる群から選ばれることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、大腸菌の変形された熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列をコードするポリヌクレオチドおよびその3'末端に連結された、ヒトインターフェロンアルファ(human Interferon α : hIFN α)をコードするポリヌクレオチドを含むヒトインターフェロン α の分泌生産用発現ベクター、前記発現ベクターで形質転換された細胞株、および前記細胞株を培養することによりアミノ末端に追加のメチオニンが添加されていないヒトインターフェロン α を大腸菌菌体のペリプラズムに分泌させて大量生産する方法に関する。

【0002】

背景技術

アイザックス(Isaacs)とリンデンマン(Lindenmann)は、1957年鶏をインフルエンザウイルスAで感染させるとウイルスの複製を阻害する因子であるインターフェロンが生産されることを発見し、報告した(Isaacs, K. and Lindenmann, J., Proc. R. Soc. Lond., B147, 258-267, 1957)。

【0003】

ヒトインターフェロンは一種のサイトカインであり、生体内免疫反応またはウイルスの増殖を阻害するタンパク質であって、これらを生成する細胞の種類によってインターフェロンアルファ(IFN α)、インターフェロンベータ(IFN β)およびインターフェロンガンマ(IFN γ)に分けられる(Kirchner, H., et al., Tex. Rep. Biol. Med., 41, 89-93, 1981; Stanton, G. J., et al., Tex. Rep. Biol. Med., 41, 84-88, 1981)。

【0004】

これらのインターフェロンは、抗ウイルス機能、抗癌機能、NK(Natural Killer)細胞の活性化および骨髓細胞の抑制機能において互いに相乗作用を有していることが知られている(Klimpel, et al., J. Immunol., 129, 76-78, 1982; Fleischmann, W. R., et al., J. Natl. Cancer Inst., 65, 863-966, 1980; Weigent., et al., Infec. Immun., 40, 35-38, 1980)。また、インターフェロンは

細胞内遺伝子の発現、構造、そして機能の調節因子として作用し、直接的な抗増殖効果 (anti-proliferating effect) を示す。

【0005】

インターフェロン α はB細胞分裂因子(mitogen)、ウイルスまたは癌細胞によって白血球が刺激されたとき生成するもので、現在まで20種以上のインターフェロンをコードする遺伝子が報告され、これは各々165個または166個のアミノ酸からなると知られている。

【0006】

初期の臨床試験に用いられたインターフェロン α はセンダイウイルス (Sendai virus) で刺激されたバフフィ・コート白血球(buffy coat leukocyte)から得られたもので、この際の純度はわずか1%程度に過ぎなかった(Cantell, K. and Hirvonen., *Tex. Rep. Biol. Med.*, 35, 138-144, 1977)。

【0007】

80年代に入り、遺伝子組換え技術によって生理活性を有するインターフェロン α を大量生産できるようになり(Goedell, D. V. et al., *Nature*, 287, 411-416, 1980)、このような組換えヒトインターフェロン α を用いた臨床試験の結果、種々の固形癌の治療に効果があること、特に、膀胱癌、腎臓癌と後天性免疫欠乏症に係るカポジ肉腫などに効果があることが示された(Torti, F.M., *J. Clin. Oncol.*, 6, 476-483, 1988; Vugrin, D., et al., *Cancer Treat. Rep.*, 69, 817-820, 1985; Rios, A., et al., *J. Clin. Oncol.*, 3, 506-512, 1985)。また、最近では、C型肝炎ウイルスの治療にも効果があることが報告されており(Davis, G. G., et al., *N. Engl. J. Med.*, 321, 1501-1506, 1989)、その治療剤としての適用範囲が日増しに拡大されている。

【0008】

白血球からのインターフェロン α 遺伝子をクローニング(cloning)した結果、インターフェロン α が少なくとも10個の異なる遺伝子で構成された遺伝子群によってコードされると明らかになったが、これは、DNA配列の遺伝子生成物が一つの均一なタンパク質を生成することではなく、インターフェロン α が類似する構造を有するサブタイプタンパク質の混合物であることを意味する。このよう

なサブタイプタンパク質はインターフェロン α -1、2、3…などと称する(Nature 290, 20-26, 1981)。

【0009】

種々のインターフェロンのうち、ヒトの白血球から精製されたヒトインターフェロン α は分子量が17,500~21,000程度であり、タンパク質mg当り 2×10^8 IU程度の非常に高い固有活性を有している。生体内インターフェロン α は165個のアミノ酸で構成されたタンパク質で、23番目アミノ酸がリジンの場合がインターフェロン α -2a(配列番号:1)、23番目アミノ酸がアルギニンの場合がインターフェロン α -2b(配列番号:2)である。ヒトインターフェロン α を生産する方法として、初期には細胞培養法を用いる方法が知られていたが、この方法は生産性が1リットル当り250 μ g程度に過ぎないため、大量生産には適していない。

【0010】

したがって、その後は遺伝子組換え技術によって微生物から比較的簡便な方法で多量のインターフェロンを生産する技術が開発され、現在まで使用されている。

【0011】

最も一般的に使用されている大腸菌を用いた製造方法においては、大腸菌細胞の特性によって開始コドンの位置に存在するATGコドンの作用によってN-末端にメチオニン残基がもう一つ添加された166個または167個アミノ酸からなるインターフェロン α が製造されるようになるが、ヒト成長ホルモンの場合には、付加されたメチオニン残基によって人体に有害な免疫反応が誘発され得ることが報告されている(ヨーロッパ特許公開第256,843号)。

【0012】

さらに、発現されたインターフェロン α の大部分が不溶性封入体の形で細胞質内に蓄積されるので、発現されたインターフェロン α は精製工程中に必ずリフォールディング工程を経て活性化された形態に転換されなければならない。このようなリフォールディング工程は非常に非効率的であり、インターフェロン α が部分的に還元された状態に存在するか、分子間ジスルフィド結合体または誤ったジ

スルフィド結合体などを形成するので、これを精製工程で再度除去しなければならないという難しさがあり、この際力価の損失が多くなる。特にミスフォールディング(misfolding)されたインターフェロンのような望ましくないインターフェロンを除去することが難しい。

【0013】

このような問題を解決するために、最近では菌体内生産よりN-末端にメチオニンの付加なしに可溶化状態で有用タンパク質を分泌生産する方法が開発されている。

【0014】

このような方法において、目的とする組換えタンパク質はN-末端にシグナルペプチドが付加された融合タンパク質として発現される。この融合タンパク質が細胞質膜を通過するとき、シグナルペプチドは大腸菌内の酵素によって除去され、天然型の目的タンパク質が分泌される。

【0015】

分泌生産方法では、アミノ酸配列および高次構造とも野生型と同様なタンパク質が得られるので、菌体内生産方法より有利である。しかし、分泌生産方法は菌体内生産方法に比べて、膜通過および連続精製工程の効率が低いので、生産量が少ない。特に、哺乳類由来のタンパク質を原核生物を用いて分泌生産すると、原核生物由来のタンパク質を分泌生産した場合に比べて生産効率が非常に低いと知られている。いきおいより効率的な分泌生産方法の開発が望まれていた。そして、韓国特許公告第93-1387号は、大腸菌のアルカリンホスファターゼのシグナルペプチドを用いてインターフェロン α の大量生産を試したが、その生産量が培養液リットル当たり 10^9 IU(10mg/培養液L)程度と非常に少なかった。したがって、微生物を用いてアミノ末端にメチオニン残基が付加されていない可溶性インターフェロン α を大量生産できる方法が切実に要求されている。

【0016】

そこで、本発明者らは前記問題を解決しようと鋭意研究した結果、既知の大腸菌(E. coli)の分泌タンパク質である熱安定性エンテロトキシンIIのシグナルペプチドを変化して高い発現率を示す新たなシグナルペプチドを製造し(韓国特許

出願第98-38061号および韓国特許出願第99-27418号)、これを用いて大量の天然型インターフェロン α が得られることを発見した。すなわち、変形された大腸菌シグナルペプチドにエンテロトキシンIIコード遺伝子の代りにインターフェロン α コード遺伝子を連結させた遺伝子を含む発現ベクターを製造し、この発現ベクターにより形質転換した形質転換微生物を培養することにより、天然型生物学的活性を有するインターフェロン α を大量分泌生産するのに成功した。

【0017】

発明の要約

したがって、本発明の目的は、ヒトインターフェロン α を分泌生産できる発現ベクターを提供することである。

【0018】

本発明の他の目的は、前記発現ベクターで形質転換された微生物を提供することである。

【0019】

本発明のまた他の目的は、前記微生物を用いてアミノ末端にメチオニン残基が付加されていない可溶性ヒトインターフェロン α を大量生産する方法を提供することである。

【0020】

発明の詳細な説明

本発明の一実施態様によれば、大腸菌の変形された熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列(以下、STII変異体と称す)をコードするポリヌクレオチドおよびその3'-末端に連結された、ヒトインターフェロン α (human Interferon α : hIFN α)をコードするポリヌクレオチドを含むヒトインターフェロン α の分泌生産用の発現ベクターが提供される。

【0021】

本発明の発現ベクターの製造のために使用されるヒトインターフェロン α をコードするポリヌクレオチドは、天然型ヒトインターフェロン α -2a(配列番号: 1)、インターフェロン α -2b(配列番号: 2)、インターフェロン α -1、

インターフェロン α -3など任意のヒトインターフェロン α のサブタイプをコードするポリヌクレオチドであってもよく、このヒトインターフェロン α サブタイプのいずれか一つをコードする変形された塩基配列を有する組換えポリヌクレオチドであってもよい。

【0022】

インターフェロン α を分泌生産するための目的で本発明のベクターにおいてヒトインターフェロン α をコードするポリヌクレオチドの5'-末端の前に連結される、大腸菌の変形された熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列をコードするポリヌクレオチドは、配列番号：3のアミノ酸配列を有する大腸菌の熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列のうち一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換された変形体、好ましくは4、20および22番目アミノ酸のうち一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換された変形体をコードするポリヌクレオチドであってもよい。そのようなポリヌクレオチドは、たとえば、配列番号：3のアミノ酸配列を有する大腸菌の熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列（STII）から4番アミノ酸がトレオニンに置換されるか（[Thr⁴] STII）；4番アミノ酸がトレオニンに、22番アミノ酸がグルタミンに各々置換されるか（[Thr⁴, Gln²²] STI I）；4番アミノ酸がトレオニンに、20番アミノ酸がバリンに、22番アミノ酸がグルタミンに各々置換されるか（[Thr⁴, Val²⁰, Gln²²] STII）；4番アミノ酸がトレオニンに、20番アミノ酸がバリンに各々置換された（[Thr⁴, Val²⁰] ST II）変形体をコードするもので、好ましくは各々配列番号：4、5、6および7のポリヌクレオチド配列を有する。しかし、コドンの縮退性(degeneracy)によって本発明の変異体をコーディングする様々なポリヌクレオチドが存在してもよく、特にアミノ酸配列に影響を及ぼさず、大腸菌の好むコドンを選択して変換されたポリヌクレオチドを使用することにより、インターフェロン α の発現量を遥かに増加させることができる。

【0023】

さらに、本発明の発現ベクターは、インターフェロン α の発現および分泌量をさらに増加させるために、大腸菌の熱安定性エンテロトキシンIIシャインーダガーノ配列（Shine-Dalgarno sequence；SD配列）（配列番号：8）またはその

変形体を変形された熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列をコードするポリヌクレオチドの5'末端の前にさらに含んでもよい。前記SD配列の変形体は配列番号：8の大腸菌の熱安定性エンテロトキシンII SD配列のうち5'末端のGAGG以下の塩基数が正常の7つ(TGATTT)より減少した6個または5個を有するもので、これらを用いるとインターフェロン α の分泌発現率が増加する。しかし、塩基数が4個より少なくなる場合は発現率が著しく減少する。本発明では、配列番号：9の配列を有する大腸菌の熱安定性エンテロトキシンII SD配列の変形体を使用することが特に好ましい。

【0024】

本発明の発現ベクターの製造に用いられるプロモーターとしては、微生物において異種タンパク質を発現できる任意のプロモーターであり得、特に大腸菌で異種タンパク質を発現させる場合lacプロモーター、Tacプロモーター、アラビノースプロモーターなどが好ましい。

【0025】

また、本発明では前記発現ベクターで微生物、たとえば、大腸菌BL21(DE3) (Novagen, USA)、大腸菌 XL-1 blue (Novagen, USA)のような大腸菌菌株を形質転換して製造された形質転換微生物が提供される。このような形質転換微生物としては、大腸菌 BL21(DE3)/pT140SSI α -2a-4T(「HM 10603」)、大腸菌BL21(DE3)/pT140SSI α -2a-4T22Q(「HM 10611」)、大腸菌BL21(DE3)/pT140SSI α -2b-4T(「HM 10703」)および大腸菌BL21(DE3)/pT140SSI α -2b-4T22Q(「HM 10711」)を例示することができ、これらは微生物寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の規定により、1999年12月23日付で韓国微生物保存センター(KCCM)(住所：120-221大韓民国ソウル西大門区弘済1洞Yurim B/D 361-221)寄託番号：第KCCM-10175号、第KCCM-10176号、第KCCM-10177号および第KCCM-10178号として各々寄託された。

【0026】

さらに、本発明では前記形質転換体を適切な条件下で培養することにより、アミノ末端に追加のメチオニンが添加されていないインターフェロン α を大腸菌ペリプラズム内に大量分泌生産する方法が提供される。培養条件は微生物形質転換

体の通常の培養条件と同様である。

【0027】

本発明の方法を用いて分泌生産できるインターフェロン α には、165個のアミノ酸からなる天然型ヒトインターフェロン $\alpha-2a$ （配列番号：1）およびインターフェロン $\alpha-2b$ （配列番号：2）だけでなく、インターフェロン $\alpha-1$ 、インターフェロン $\alpha-3$ など任意のヒトインターフェロン α サブタイプが含まれる。また、本発明の方法はインターフェロン β およびインターフェロン γ など他のインターフェロンの分泌生産に適用してもよい。

【0028】

本発明によれば、大腸菌形質転換体によって生産されたインターフェロン α のうち80%以上がペリプラズム内に分泌されるので、インターフェロン α を培養培地1リットル当たり1g以上の高い収率で分泌生産でき、このように生産されたインターフェロン α はアミノ末端部位に他のアミノ酸の付加なしに天然型と同様なアミノ酸配列を有し、細胞内で天然型のインターフェロン α と同様の生物学的力価を示す。

【0029】

以下、本発明を下記実施例によってさらに詳細に説明するが、かかる実施例は本発明の範囲を制限するものではない。

【0030】

参考例：インターフェロン $\alpha-2a$ 遺伝子およびそれを含むベクターの製作

ヒトインターフェロン $\alpha-2a$ 遺伝子を得るために、ヒトゲノムDNAを鋳型とし、配列番号：10および11の塩基配列を有するオリゴプライマーとして用いた重合酵素連鎖反応（PCR）を行った。配列番号：10のプライマーは天然型hIFN α の一番アミノ酸であるシステインの上流に制限酵素Nde I認識部位（5'-CATATG-3'）を設けるようにデザインし、配列番号：11のプライマーは終了コドンの後側に制限酵素BamH I認識部位（5'-GGATCC-3'）を設けるようにデザインされた。

【0031】

増幅されたPCR産物をNde IとBamH Iで切断してhIFN $\alpha-2a$ をコードするDNA

断片を得た。前記DNA断片をベクターpET-14b (Novagen, USA)のNde I/BamHI切断部位に挿入してベクターpT-IFN α -2aを得た。

図1は、ベクターpT-IFN α -2aの製作過程を示す。

【0032】

比較例1：エンテロトキシシンIIシグナル配列およびIFN α -2a遺伝子を含有するベクターの製作

大腸菌エンテロトキシシンIIシグナル配列遺伝子を製造するために、大腸菌エンテロトキシシンIIシグナル配列の公知のヌクレオチド配列に基づいて配列番号：12および13の相補的なオリゴヌクレオチド対を考案し、DNAシンセサイザ(Model 380B, Applied Biosystem, USA)を用いて合成した。前記オリゴヌクレオチドは、大腸菌エンテロトキシシンIIの開始コドン前に制限酵素BspHI認識部位(制限酵素NcoI認識部位と相補的である)を有し、3'末端にはアミノ酸の変化なしにコドンのみを変えて制限酵素MluI認識部位を有するように考案された。2つのオリゴヌクレオチドを95℃でアニーリングして大腸菌エンテロトキシシンIIシグナル配列遺伝子を含有する平滑末端DNA断片を製造した。該DNA断片をベクターpUC19(Biolabs, USA)のSmaI部位に挿入してベクターpUC19STを製作した。

【0033】

また、エンテロトキシシンIIシグナルペプチドとIFN α -2a遺伝子を連結するために、IFN α -2a遺伝子を含有する参考例のベクターpT-IFN α -2aを鋳型とし、配列番号：14および15のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCRを行った。配列番号：14のプライマーはIFN α -2a遺伝子の5'末端に対応し、配列番号：15のプライマーは終了コドン後に制限酵素BamHI認識配列(5'-GGATCC-3')を挿入するように考案された。天然型IFN α -2aをコードするポリヌクレオチド配列を含有するDNA断片を前記ポリヌクレオチドプライマーを用いたPCRによって増幅した。増幅されたDNA断片を制限酵素MluIとBamHIで切断してMluIとBamHI末端を有するIFN α -2a DNA断片を製造した。

【0034】

一方、エンテロトキシシンIIシグナルペプチドを含有するベクターpUC19STを制限

酵素MluIで切断した後制限酵素BamHIで消化してMluIとBamHI末端を有するベクター断片を得た。該ベクター断片を前記のIFN α -2a DNA断片と連結してベクターpUC19SIFN α -2aを製作した。

【0035】

ベクターpUC19SIFN α -2aを制限酵素BspHIとBamHIでさらに切断してDNA断片(564bp)を回収した。ベクターpET-14b (Novagen)をNcoIとBamHIで切断してベクター断片を作った後、前記DNA断片とベクター断片を互いに連結してベクターpT14SIFN α -2aを製作した。図2は、ベクターpT14SIFN α -2aの製作過程を示す。

【0036】

次いで、大腸菌BL21 (DE3) 菌株を70mM塩化カルシウム溶液で処理してコンピテント大腸菌に製造し、10mMトリス緩衝溶液(pH7.5)中のベクターpT14SIFN α -2aの懸濁液を加えた。ベクターによって伝達された抗生物質に対する耐性および感受性を用いて通常の方法で形質転換株を選択することにより、IFN α -2aを発現する大腸菌形質転換株HM 10600を製造した。

【0037】

また、ベクターpT14SIFN α -2aを鋳型とし、配列番号：16および17の合成オリゴヌクレオチドを用いたPCR法によってエンテロトキシンのシャインーダルガーノ配列、エンテロトキシシグナルペプチドおよびIFN α -2a遺伝子が順番に連結されたDNA断片を得た後、これをXbaIとBamHIで切断して挿入体を得た。

ベクターpET-14b (Novagen)をXbaIとBamHIで切断したベクター断片と前記の挿入体を連結してベクターpT14SSIFN α -2aを製作した。図3は、ベクターpT14SSIFN α -2aの製作過程を示す。大腸菌BL21 (DE3) をベクターpT14SSIFN α -2aで形質転換して大腸菌形質転換株HM 10601を製造した。

【0038】

比較例2：エンテロトキシシグナル配列およびIFN α -2b遺伝子を含有するベクターの製作

特定部位置換法(site directed mutagenesis) (Papworth, C. et al., Strategies, 9, 3(1996))に従って、ベクターpT14SSIFN α -2aに含まれたINF α -2a遺伝子の

23番位置のリジンコドンを実アルギニンコドンに置換することにより、 $\text{INF}\alpha\text{-2b}$ 遺伝子を含む発現ベクターを製作した。鑄型としてベクターpT14SSl $\alpha\text{-2a}$ を置換されたコドンを含むする下記配列番号：19および20の合成オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションしてハイブリッド分子を形成し、このオリゴヌクレオチドを経て5'→3'方向に延長したp f u (Stratagene)と4つのヌクレオチドトリホスフェート(ATP, GTP, TTP, CTP)を用いてDNA増幅を行った。

インターフェロン $\alpha\text{-2b}$ 配列

17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys (配列番号：18)

CTC CTG GCA CAG ATG AGG AGA ATC TCT CTT TTC TCC TGC (配列番号：19)

GCA GGA GAA AAG AGA GAT TCT CCT CAT CTG TGC CAG GAG (配列番号：20)

【0039】

増幅されたDNA断片を回収し、これに制限酵素DpnIを加えて転換されていないベクターを完全に除去した。

変形されたプラスミドを用いて大腸菌 XL-1 blue (Novagene)を形質転換した後、形質転換されたコロニーから回収されたDNAの塩基配列を決定し、 $\text{INF}\alpha\text{-2a}$ の23番アミノ酸のリジンがアルギニンに置換された遺伝子を含むベクターpT14SSl $\alpha\text{-2b}$ を製造した。

【0040】

次いで、前記ベクターpT14SSl $\alpha\text{-2b}$ を用いて前記比較例1と同様の方法で大腸菌BL21 (DE3)菌株を形質転換して大腸菌形質転換株HM 10701を得た。この形質転換株を培養して生産されたタンパク質のN-末端アミノ酸配列を分析した結果、天然型と同様なアミノ酸配列を有するインターフェロン $\alpha\text{-2b}$ の発現を確認した。

【0041】

実施例1：エンテロトキシニングナルペプチド変形体を含むベクターの製作

(1) [Thr⁴] STIIを含むベクターの製作

エンテロトキシニングナル配列ペプチド中の特定アミノ酸残基のみを変形させるために公知の方法である特定部位置換法 (site directed mutagenesis方法)

を用いてエンテロトキシン変形体シグナル配列をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを次の通りに製造した。

【0042】

まず、比較例2のような特定部位置換法により、前記比較例1で製造されたベクターpT14SSI α -2aを配列番号：22および23のオリゴヌクレオチドを用いたPCRに付し、エンテロトキシシグナル配列の4番目アミノ酸をトレオニン（Thr）に置換した変形されたプラスミドを製造した。

Met Lys Lys Thr Ile Ala Phe Leu （配列番号：21）

5'-GGTGATTTT ATG AAA AAG ACA ATC GCA TTT CTT C-3' （配列番号：22）

3'-CCACTAAAA TAC TTT TTC TGT TAG CGT AAA GAA G-5' （配列番号：23）

【0043】

変形されたプラスミドを用いて大腸菌XL-1 blue（Novagene, USA）を形質転換した。形質転換されたコロニーから回収したDNAの塩基配列を決定し、4番目アミノ酸がThrに変形されたエンテロトキシシグナル配列ペプチドをコードするポリヌクレオチドが含まれたベクターを得た。前記ベクターをXbaIとMluIで切断し、次いで、ベクターpT14SSI α -2aのXbaI/MluI部位に挿入してベクターpT14SSI α -2a-4Tを製作した。

【0044】

次いで、前記ベクターpT14SSI α -2a-4Tを用いて大腸菌BL21（DE3）（Stratagene, USA）を形質転換して大腸菌形質転換株HM 10602を得た。

また、同様の方法でpT14SSI α -2bを用いてpT14SSI α -2b-4Tベクターを製造した後大腸菌BL21（DE3）を形質転換して大腸菌形質転換株HM10702を得た。

【0045】

（2）[Thr⁴, Gln²²] STIIを含むベクターの製作

4番アミノ酸がThrに置換されたエンテロトキシシグナル配列ペプチドの2番目アミノ酸をGlnにさらに置換するために、前記段階（1）で製造されたベクターpT14SSI α -2a-4Tおよび配列番号：25および26のオリゴヌクレオチドを用いて比較例2のような特定部位置換法によって変形されたベクターを製造した。

Asn Ala Gln Ala Cys Asp Leu Pro （配列番号：24）

5'-CA AAT GCC CAA GCG TGT GAT CTG CCT-3' (配列番号：25)

3'-GT TTA CGG GTT CGC ACA CTA GAC GGA-5' (配列番号：26)

【0046】

変形されたプラスミドを用いて大腸菌XL-1 blue (Novagene, USA)を形質転換した。形質転換されたコロニーから回収したDNAの塩基配列を決定し、4番目アミノ酸がThrに、22番目アミノ酸がGlnに各々変形されたエンテロトキシニンシグナル配列を含むベクターpT14SSl α -2a-4T22Qを得た。次いで、前記ベクターpT14SSl α -2a-4T22Qを用いて前記段階(1)と同様な方法で大腸菌BL21 (DE3) (Stratagene, USA)を形質転換して大腸菌形質転換株HM 10604を得た。

【0047】

前記のように変形されたエンテロトキシニンシグナル配列のシャインーダルガーノ配列を配列番号：9のように変形させるために、前記で製造されたベクターpT14SSl α -2a-4TおよびpT14SSl α -2a-4T22Qを鋳型とし、配列番号：27および28のオリゴヌクレオチドを用いて段階(2)のような特定部位置換法によって変形されたベクターを製造した。

【0048】

変形されたプラスミドを用いて大腸菌XL-1 blue (Novagene, USA)を形質転換した。形質転換されたコロニーから回収したDNAの塩基配列を決定し、エンテロトキシニンシグナル配列のシャインーダルガーノ配列を変形させたベクターpT140SSl α -2a-4TとpT140SSl α -2a-4T22Qを得た。図4は、ベクターpT140SSl α -2a-4T22Qの製作過程を示す。

【0049】

次いで、それぞれ前記ベクターpT140SSl α -2a-4TとpT140SSl α -2a-4T22Qを用いて大腸菌BL21 (DE3)を形質転換して大腸菌形質転換株HM 10603とHM 10611を得、これを1999年12月23日付で韓国微生物保存センター(KCCM)に寄託番号第KCCM-10175号および第KCCM-10176号として寄託した。

また、同様の方法でpT14SSl α -2bを用いてpT140SSl α -2b-4TとpT140SSl α -2b-4T22Qのベクターを製造した後大腸菌BL21 (DE3)を形質転換して大腸菌形質転換株HM 10703とHM 10711を得、これを1999年12月23日付で韓国微生物保存セ

ンター (KCCM) に寄託番号第 KCCM-10177 号および第 KCCM-10178 号として各々寄託した。

【0050】

(3) [Thr⁴, Val²⁰, Gln²²] STII を含むベクターの製作

4 番アミノ酸が Thr に、22 番アミノ酸が Gln に置換されたエンテロトキシニンシグナル配列ペプチドの 20 番目アミノ酸を Val にさらに置換するために、前記段階 (2) で製造されたベクター pT140SSI α -2a-4T22Q および pT140SSI α -2b-4T22Q を各々鋳型とし、配列番号: 29 および 30 のオリゴヌクレオチドを用いて前記段階 (2) のような特定部位置換法によって変形されたベクター pT140SSI α -2a-4T20V22Q と pT140SSI α -2b-4T20V22Q を製造した。

【0051】

変形されたプラスミドを用いて大腸菌 XL-1 blue (Novagen, USA) を形質転換した。形質転換されたコロニーから回収した DNA の塩基配列を決定し、エンテロトキシニンシグナル配列のうち 4 番目、20 番目および 22 番目アミノ酸が各々アスパラギン、アスパラギン、チロシンからトレオニン、バリンおよびグルタミンに置換された配列を有するインターフェロン α 発現ベクター pT140SSI α -2a-4T20V22Q および pT140SSI α -2b-4T20V22Q を得、変形されたプラスミドを用いて大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換して大腸菌形質転換株 HM 10612 および HM 10712 を各々得た。

【0052】

実施例 2: 熱安定性エンテロトキシニンII シャインーダルガーノ配列変形体の製造

前記で製造された発現ベクターに含まれた熱安定性エンテロトキシニンII シャインーダルガーノ配列のうち、リボソーム結合部位と大腸菌の変形された熱安定性エンテロトキシニンII シグナル配列の開始コドンである A T G 配列間の塩基数を減らすために、前記の比較例 2 のような特定部位置換法によって変形されたベクターを製造した。

【0053】

すなわち、リボソーム結合部位 GAGG から開始コドンである A T G 配列までの塩基数を正常の 7 個から 5 個に減らすために、前記実施例 1 の (2) で製造された

ベクターpT140SSI α -2a-4T22Qを鋳型とし、配列番号：31および32のオリゴヌクレオチドを用いて比較例2のような特定部位置換法によって変形されたベクターpT14NSSI α -2a-4T22Qを製造した。また、リボソーム結合部位GAGGから開始コドンであるATG配列までの塩基数を4個に減らすためにpT14NSSI α -2a-4T22Qを鋳型とし、配列番号：33および34のオリゴヌクレオチドを用いて比較例2のような特定部位置換法によって変形されたベクターpT14MSSI α -2a-4T22Qを製造した。

【0054】

変形されたプラスミドを用いて大腸菌XL-1 blueを形質転換した。形質転換されたコロニーから回収したDNAの塩基配列を決定し、リボソーム結合部位GAGGから開始コドンであるATG配列までの塩基数が5個と4個に各々減少した塩基配列を有するインターフェロン α 発現プラスミドpT14NSSI α -2a-4T22QおよびpT14MSSI α -2a-4T22Qを得、この発現プラスミドで大腸菌BL21 (DE3) を形質転換して大腸菌形質転換株HM 10613およびHM 10614を得た。

【0055】

実施例3：インターフェロン α -2の発現量比較

前記比較例および実施例で得られた大腸菌形質転換体を各々LB培地で培養した後IPTGを加えて3時間培養した。各々の培養液を6,000rpmで20分間遠心分離した後、沈殿した細胞塊を浸透圧ショック法 (Nossal, G. N., J. Biol. Chem., 241, 3055, 1966) に従って次のように処理した。

【0056】

すなわち、沈殿物分画を元来培養液量の10分の1容積の等張液 (20%スクロース、1mM EDTAを含有する10mMトリス-塩酸緩衝液 (pH7.0) に懸濁し、前記懸濁液を室温で30分間放置した後、遠心分離して菌株を回収した。次に、回収された菌体を4℃の蒸留水に懸濁することにより、菌体のペリプラズムに存在するタンパク質を抽出した。懸濁液を遠心分離して菌体成分を除去し、上澄液をペリプラズム分画として回収した。ペリプラズム分画として回収されたインターフェロン α -2の濃度をインターフェロン α -2に対する抗体 (R&D, USA) を用いた通常の酵素免疫測定法 (Kato, K. et al., J. Immunol., 116

, 1554, 1976)に従って測定し、その測定値から培養培地 1 リットル当たりのインターフェロン α -2の分泌量を換算した。前記結果を表 1 に示す。

【0057】

【表 1】

表 1 インターフェロン α -2の発現量比較

発現 宿主	実施例	発現ベクター	STH 内の 変形アミノ 酸残基	ペリプラズム内 IFN α -2 生産量*
HM 10600	比較例 1	pT14SI α -2a		82 \pm 40
HM 10601	比較例 1	pT14SSI α -2a		325 \pm 75
HM 10701	比較例 2	pT14SSI α -2b		288 \pm 90
HM 10602	実施例 1 (1)	pT14SSI α -2a-4T	Thr ⁴	550 \pm 120
HM 10603	実施例 1 (2)	pT14OSSI α -2a- 4T	Thr ⁴	1,020 \pm 135
HM 10604	実施例 1 (2)	pT14SSI α -2a- 4T22Q	Thr ⁴ , Gln ²²	680 \pm 105

HM 10611	実施例 1 (2)	pT14OSS1 α -2a- 4T22Q	Thr ⁴ , Gln ²²	1,220 \pm 120
HM 10612	実施例 1 (3)	pT14OSS1 α -2a- 4T20V22Q	Thr ⁴ , Val ²⁰ , Gln ²²	1,130 \pm 180
HM 10613	実施例 2	pT14NSS1 α -2a- 4T22Q	Thr ⁴ , Gln ²²	750 \pm 144
HM 10614	実施例 2	pT14MSS1 α -2a- 4T22Q	Thr ⁴ , Gln ²²	420 \pm 100
HM 10702	実施例 1 (1)	pT14SS1 α -2b-4T	Thr ⁴	370 \pm 90
HM 10703	実施例 1 (2)	pT14OSS1 α -2b- 4T	Thr ⁴	735 \pm 117
HM 10711	実施例 1 (2)	pT14OSS1 α -2b- 4T22Q	Thr ⁴ , Gln ²²	1,070 \pm 150
HM 10712	実施例 1 (3)	pT14OSS1 α -2b- 4T20V22Q	Thr ⁴ , Val ²⁰ , Gln ²²	820 \pm 160

註) * IFN α mg / 100 O.D._{600nm} / L培養液

【0058】

実施例 4：後処理および精製

実施例 3 と同様の方法で実施例 1 の (2) で得られた大腸菌形質転換株 HM 10611 を培養した後、培養液を 6, 000 rpm で 20 分間遠心分離して細胞を収穫し、浸透圧ショック法によってペリプラズム分画を収穫した。

収穫されたペリプラズム分画を pH 5.0 ~ 5.5 に調整した後 pH 5.3 に予め平衡化された S-セファロース (S-Sepharose; Pharmacia Inc., Sweden) カラムに結合させ、25 mM NaCl 溶液で十分洗浄した。その後、各々 50 mM、100 mM、200 mM および 1 M NaCl 溶液を含む酢酸緩衝溶液を連続的に加えて IFN α -2 を溶離させ、IFN α -2 を含む分画を集め、合せた。

【0059】

合せた分画をブルーセファロース (Blue Separose; Pharmacia Inc., Sewden) カラムクロマトグラフィーに通し、2 M以上のNaClを含むカラム緩衝溶液を加えて溶離させて活性分画を得た。

【0060】

前記活性分画を緩衝液に透析した後、最終的にpH5.8でDEAE陰イオン交換樹脂カラムを用いた樹脂カラム分画を行って99%以上の純度を有するインターフェロン α -2aを得た。また、大腸菌形質転換株HM 10711を用いて同様の実験を繰り返してインターフェロン α -2bを精製した。

【0061】

精製されたインターフェロン α -2aおよび2bの純度と大略の濃度を決定するためにSDS-PAGEを行ってから実施例3のような通常の酵素免疫測定法を用いてペリプラズム溶液内インターフェロン α の正確な濃度を分析した。また、N-末端アミノ酸配列分析を通じてインターフェロン α -2aおよび2bは追加のメチオニンを含み天然型であることを確認した。

【0062】

実施例5：組換え菌株から生成したインターフェロン α -2aの分子量確認

SDS-PAGEおよびウェスタンブロットングを用いて組換え菌株から生産されたインターフェロン α -2aおよび2bの発現および分子量を確認した。

まず、実施例4で得られた大腸菌形質転換株HM 10611のペリプラズム分画およびこれを精製したIFN α -2aを、IFN α -2a商用対照品(3×10^6 IU/ml)を対照群として、通常の方法に従ってSDS-PAGEで分析した。図5aは前記SDS-PAGE結果を示すもので、ここでレーン (lane) 1はIFN α -2a対照群であり、レーン2は大腸菌形質転換株HM 10611のペリプラズム分画であり、レーン3は精製されたIFN α -2aである。図5aから分かるように、精製されたインターフェロン α -2aが天然型インターフェロン α -2aと同様の分子量を有し、大腸菌形質転換株HM 10611のペリプラズム分画に大量で含まれていることを確認した。

【0063】

また、形質転換株HM 10711のペリプラズム分画、S-セファロースカラムカラ

ムクロマトグラフィーで精製された分画および最終精製されたIFN α -2bを用いて通常の方法でSDS-PAGEを行った。

【0064】

ニトロセルロース膜 (Bio-Rad Lab, USA) をブロットイング (blotting) 用緩衝液 (170mMグリシン(glicine)、25mM Tris・HCl(pH8)、20%メタノール) に十分濡らした後ゲル上に分離されたタンパク質をブロットイングキットを用いて3時間にわたってニトロセルロース膜に移した。その後ニトロセルロース膜を1%カゼイン溶液に1時間放置し、0.05%ツイーン20 (Tween 20) を含むPBS溶液で3回洗浄した。洗浄後、ウサギ抗-IFN α 抗体 (Chemicon, # AB1434, USA) をPBSで希釈して加えてから室温で2時間反応させた。反応が終了した後PBST溶液で3回洗浄して反応しなかった抗体を除去した。これにHRP (horseradish peroxidase) -接合されたヤギ抗-ウサギIgG (Bio-Rad Lab, USA) 溶液をPBSで希釈して加えた後、さらに室温で2時間反応させた。その後、膜をPBSTで洗浄し、ペルオキシダーゼ基質キット (Bio-Rad Lab, USA) 溶液を加えて発色させた。前記ウェスタンブロットイング結果を図5bに示し、ここでレーン1は形質転換株HM 10711の醗酵後のペリプラズム分画、レーン2はS-セファロースカラムクロマトグラフィーで精製された分画、レーン3は最終精製されたIFN α -2bを示す。

【0065】

本実施例の結果から、本発明の組換え大腸菌菌株から大量の可溶性インターフェロン α が発現されることを確認できる。

【0066】

特許手続上の微生物寄託の国際的承認に関するブダペスト条約

国際様式

受領人: Hanmi Pharm. Co., Ltd

大韓民国京畿道華城郡八灘面下楮里893-5番地

下記国際寄託機関により、規則7.1に基づいて発行された原寄託に関する受託証

I.微生物の表示	
寄託者による識別標識： HM10603	国際寄託機関が付与した受託番号： KCCM-10175
II.科学的性質および／または提示された分類学上の位置	
上記 I 欄に表示された微生物には次が添付されている： <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置 (適用欄に x 表示)	
III.受付および受託	
本国際寄託機関は、上記 I に表示された微生物を受託し、上記微生物は 1999 年 12 月 23 日付で受け付けられた(原寄託日) ¹	
IV.国際寄託機関	
名称：韓国微生物保存センター 住所：120-091 大韓民国ソウル西大門区弘済 1 洞 361-221 Yurim B/D	本国際寄託機関の代表者署名： 日付：1999 年 12 月 29 日

¹ 規則 6.4(d)が適用される場合、この日は国際寄託機関の地位を獲得した日である：国際寄託機関の地位を獲得した後、ブダペスト条約の外で行われた寄託をブダペスト条約に基づく寄託に転換する場合、この日は国際寄託機関が微生物受領した日である。

【0067】

特許手続上の微生物寄託の国際的承認に関するブダペスト条約

国際様式

受領人：Hanmi Pharm. Co., Ltd

大韓民国京畿道華城郡八灘面下楮里893-5番地

下記国際寄託機関により、規則7.1に基づいて発行された原寄託に関する受託証

I.微生物の表示	
寄託者による識別標識： HM10611	国際寄託機関が付与した受託番号： KCCM-10176
II.科学的性質および／または提示された分類学上の位置	
上記 I 欄に表示された微生物には次が添付されている： <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置 (適用欄に x 表示)	
III.受付および受託	
本国際寄託機関は、上記 I に表示された微生物を受託し、上記微生物は 1999 年 12 月 23 日付で受け付けられた(原寄託日) ¹	
IV.国際寄託機関	
名称：韓国微生物保存センター 住所：120-091 大韓民国ソウル西大門区弘済 1 洞 361-221 Yurim B/D	本国際寄託機関の代表者署名： 日付：1999 年 12 月 29 日

¹ 規則 6.4(d)が適用される場合、この日は国際寄託機関の地位を獲得した日である：国際寄託機関の地位を獲得した後、ブダペスト条約の外で行われた寄託をブダペスト条約に基づく寄託に転換する場合、この日は国際寄託機関が微生物受領した日である。

【0068】

特許手続上の微生物寄託の国際的承認に関するブダペスト条約

国際様式

受領人：Hanmi Pharm. Co., Ltd

大韓民国京畿道華城郡八灘面下楮里893-5番地

下記国際寄託機関により、規則7.1に基づいて発行された原寄託に関する受託証

I.微生物の表示	
寄託者による識別標識： HM10703	国際寄託機関が付与した受託番号： KCCM-10177
II.科学的性質および／または提示された分類学上の位置	
上記 I 欄に表示された微生物には次が添付されている： <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置 (適用欄に x 表示)	
III.受付および受託	
本国際寄託機関は、上記 I に表示された微生物を受託し、上記微生物は 1999 年 12 月 23 日付で受け付けられた(原寄託日) ¹	
IV.国際寄託機関	
名称：韓国微生物保存センター 住所：120-091 大韓民国ソウル西大門区弘済 1 洞 361-221 Yurim B/D	本国際寄託機関の代表者署名： 日付：1999 年 12 月 29 日

¹ 規則 6.4(d)が適用される場合、この日は国際寄託機関の地位を獲得した日である：国際寄託機関の地位を獲得した後、ブダペスト条約の外で行われた寄託をブダペスト条約に基づく寄託に転換する場合、この日は国際寄託機関が微生物受領した日である。

【0069】

特許手続上の微生物寄託の国際的承認に関するブダペスト条約

国際様式

受領人：Hanmi Pharm. Co., Ltd

大韓民国京畿道華城郡八灘面下楮里893-5番地

下記国際寄託機関により、規則7.1に基づいて発行された原寄託に関する受託証

I.微生物の表示	
寄託者による識別標識： HM10711	国際寄託機関が付与した受託番号： KCCM-10178
II.科学的性質および／または提示された分類学上の位置	
上記 I 欄に表示された微生物には次が添付されている： <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置 (適用欄に x 表示)	
III.受付および受託	
本国際寄託機関は、上記 I に表示された微生物を受託し、上記微生物は 1999 年 12 月 23 日付で受け付けられた(原寄託日) ¹	
IV.国際寄託機関	
名称：韓国微生物保存センター 住所：120-091 大韓民国ソウル西大門区弘済 1 洞 361-221 Yurim B/D	本国際寄託機関の代表者署名： 日付：1999 年 12 月 29 日

¹ 規則 6.4(d)が適用される場合、この日は国際寄託機関の地位を獲得した日である：国際寄託機関の地位を獲得した後、ブダペスト条約の外で行われた寄託をブダペスト条約に基づく寄託に転換する場合、この日は国際寄託機関が微生物受領した日である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Hanmi Pharm. Co., Ltd.

<120> Expression and secretion vector for human interferon alpha and process for producing human interferon alpha by employing same

<130> PCA10105/HMY

<150> KR 2000-2434

<151> 2000-01-19

<160> 34

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 165

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Cys Asp Leu Pro Glu Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met

1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp

20 25 30

Arg Arg Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln

35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe

50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu

65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu

85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 2
<211> 165
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Cys Asp Leu Pro Glu Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg Arg Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160

Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 3
<211> 23
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 3
Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
1 5 10 15

Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala
20

<210> 4
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA encoding a modified B. coli thermostable enterotoxin II
([Thr4] ST II)
<400> 4

atgaaaaaga caatcgcat tctctctgca tctatgttcg tttttctat tgcataaat 60
gcctacgcg 69

<210> 5
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA encoding a modified E. coli thermostable enterotoxin II
([Thr4, Gln22] ST II)

<400> 5
atgaaaaaga caatcgcat tctctctgca tctatgttcg tttttctat tgcataaat 60
gcccaagcg 69

<210> 6
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA encoding a modified E. coli thermostable enterotoxin II
([Thr4, Val20, Gln22] ST II)

<400> 6
atgaaaaaga caatcgcat tctctctgca tctatgttcg tttttctat tgcacagtt 60
gcccaagcg 69

<210> 7
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA encoding a modified E. coli thermostable enterotoxin II
([Thr4, Val20] ST II)

<400>	7	
atgaaaaaga caatgcatt tcttcttgca tctatgttcg tttttctat tgcacagtt		60
gcctacgag		69
<210>	8	
<211>	11	
<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli	
<400>	8	
gaggtgattt t		11
<210>	9	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Modified Shine-Dalgarno sequence of E. coli thermostable enterotoxin II	
<400>	9	
gaggtg'ittt		10
<210>	10	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer for preparing the N-terminal of interferon alpha-2a	
<400>	10	
cgccgccata tctgtgalet gectcaaac cacag		35

<210>	11	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer for preparing the C-terminal of interferon alpha-2a	
<400>	11	
	accgaattcg gacctcatt ccttactct taaact	36
<210>	12	
<211>	72	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer for the preparation of the secretion sequence of E. coli thermostable enterotoxin II	
<400>	12	
	tcataaaaa gaatacgca ttcttcttg catctatgtt cgtttttct atgctacaa	60
	atgcctacgc gt	72
<210>	13	
<211>	72	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer for the preparation of the secretion sequence of E. coli thermostable enterotoxin II	
<400>	13	
	acgcgtaggc attttagca atagaaaaa cgaacataga tgcaagaaga aatgcgatat	60
	tcitttcat ga	72

<210>	14	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer for preparing the N-terminal of interferon alpha-2a	
<400>	14	
	acaaatgcct acgcgigiga tctgcctcaa acccacag	38
<210>	15	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer for preparing the C-terminal of interferon alpha-2a	
<400>	15	
	accgaattcg gatcctcatt ccttacttct taaact	36
<210>	16	
<211>	65	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer for introducing Shine-Dalgarno sequence of E. coli ST II	
<400>	16	
	cggtttccct ctgagggttg aggtgtttta tgaanaagaa tatgcattt ctcttgcac	60
	ctatg	65
<210>	17	
<211>	36	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer for introducing Shino-Dalgarno sequence of E. coli ST II
 <400> 17
 accgaattcg gatctctcatt ccttacttct taaact 36
 <210> 18
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 18
 Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide for preparing interferon alpha-2b
 <400> 19
 ctcttggeac agatgaggag aatctctctt ttctctgtc 39
 <210> 20
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> anti-sense of SEQ ID NO: 19
 <400> 20

gaggaccgtg tciactctc ttagagagaa aagaggacg

39

<210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 1st to 8th amino acids of [Thr4] ST II

<400> 21
Met Lys Lys Thr Ile Ala Phe Leu
1 5

<210> 22
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligonucleotide for preparing [Thr4] ST II

<400> 22
ggtgatttta tgaaaaagac aatcgcaitt cttc

34

<210> 23
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> anti-sense of SEQ ID NO: 22

<400> 23
gaagaaaagc gattgtctt ttcataaaat cacc

34

<210> 24

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> 20th to 27th amino acids of [Gln22] ST II

 <400> 24
 Asn Ala Gln Ala Cys Asp Leu Pro Gln Thr His
 1 5 10

<210> 25
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide for preparing [Gln22] ST II

<400> 25
 caaatgccca agcgtgtgat ctgectcaaa cccacag 37

<210> 26
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> anti-sense of SEQ ID NO: 25

<400> 26
 ctgtgggtt gaggcagatc acacgttgg gcatttg 37

<210> 27
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer for preparing the modified Shine-Dalgarno sequence of SEQ
 ID NO: 9

<400> 27
 tctagagggt gaggtggttt atga 24

<210> 28
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> anti-sense of SEQ ID NO: 27

<400> 28
 tcataaaaca cctcaacctc taga 24

<210> 29
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> oligonucleotide for preparing [Val20] ST II

<400> 29
 gttttticta ttgctacagt tgcccaagcg tggatctgc ct 42

<210> 30
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

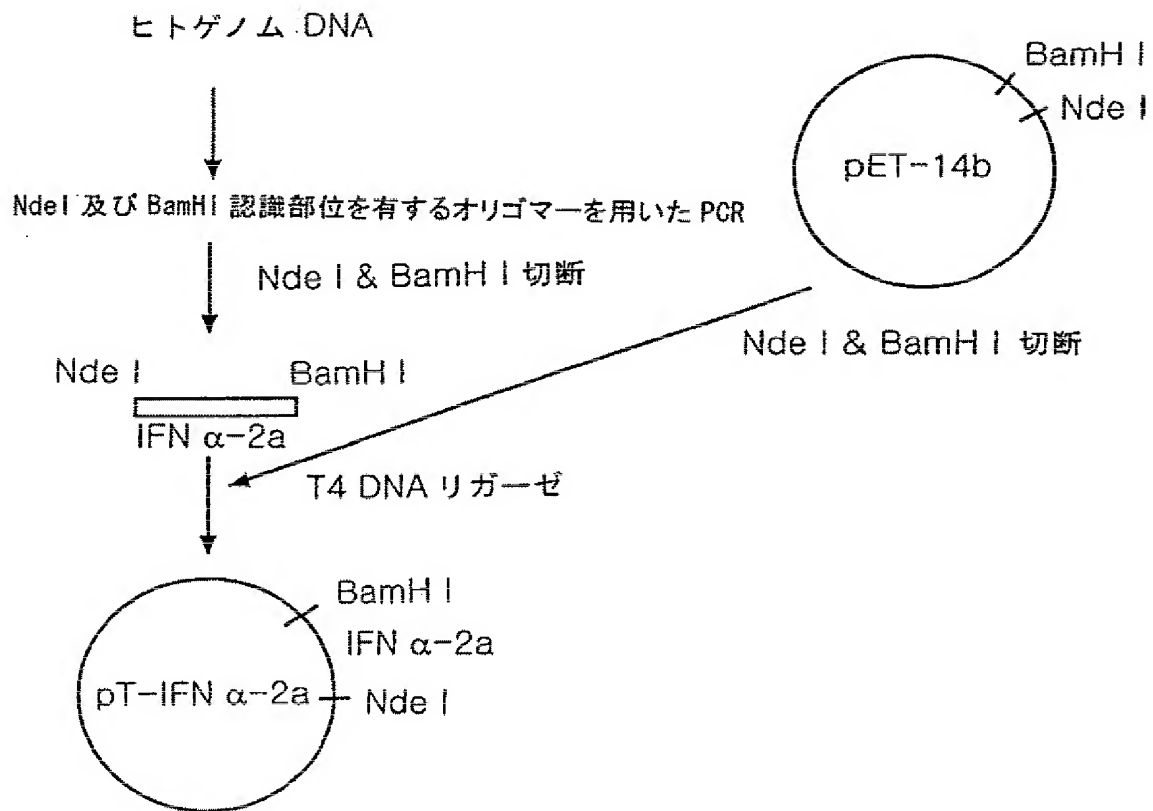
<220>
 <223> anti-sense of SEQ ID NO: 29

<400>	30	
aggcagatca cgcgttggg caactgtagc aatagaaaa ac		42
<210>	31	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer for preparing a modified Shine-Dalgarno sequence	
<400>	31	
tctagagggt gaggtttta tgaaa		25
<210>	32	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	anti-sense of SEQ ID NO: 31	
<400>	32	
ttcataaaa acctaacct ctaga		25
<210>	33	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	primer for preparing a modified Shine-Dalgarno sequence	
<400>	33	
tctagagggt gaggtttat gaaa		24
<210>	34	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	anti-sense of SEQ ID NO: 33	
<400>	34	
ttcataaaa cctcaaccic laga		24

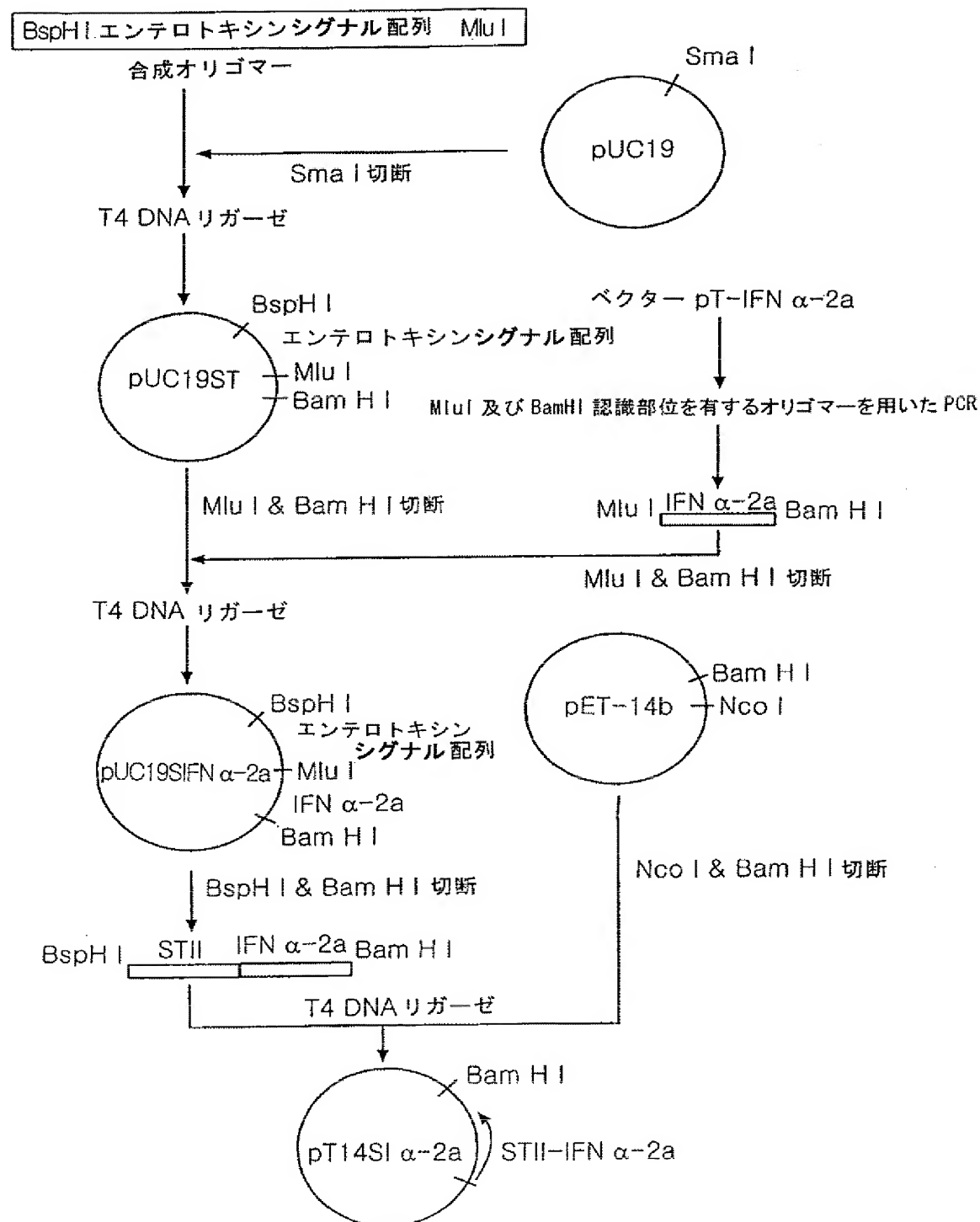
【図面の簡単な説明】

- 【図 1】 図 1 は、ベクター-pT-IFN α -2aの製作過程を示す。
- 【図 2】 図 2 は、ベクター-pT14SI α -2aの製作過程を示す。
- 【図 3】 図 3 は、ベクター-pT14SSI α -2aの製作過程を示す。
- 【図 4】 図 4 は、ベクター-pT140SSI α -2a-4T22Qの製作過程を示す。
- 【図 5】 図 5 a および図 5 b は、組換え細胞株からのインターフェロン α -2a (IFN α -2a) の発現如何と、発現された INF α -2a の精製度を確認した SDS-PAGE 結果および発現された IFN α -2b の分子量を確認したウェスタンブロッティング結果を示す。

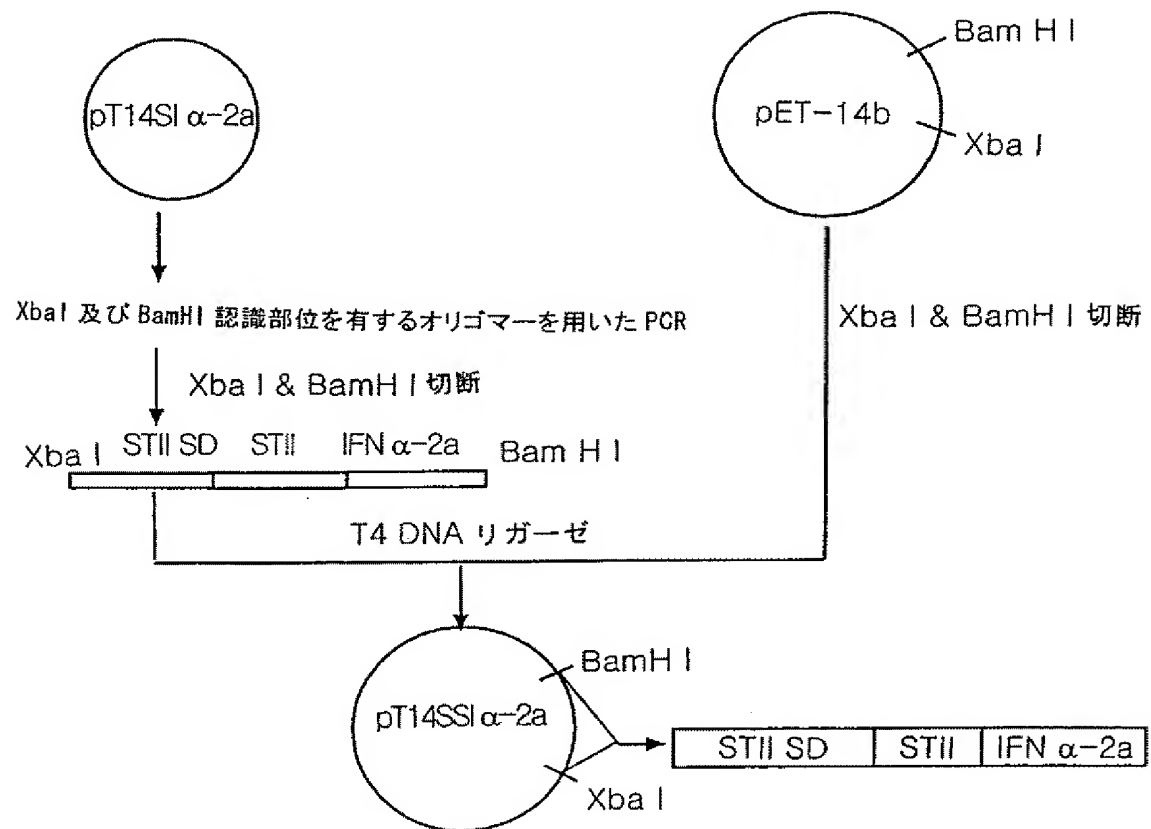
【図 1】



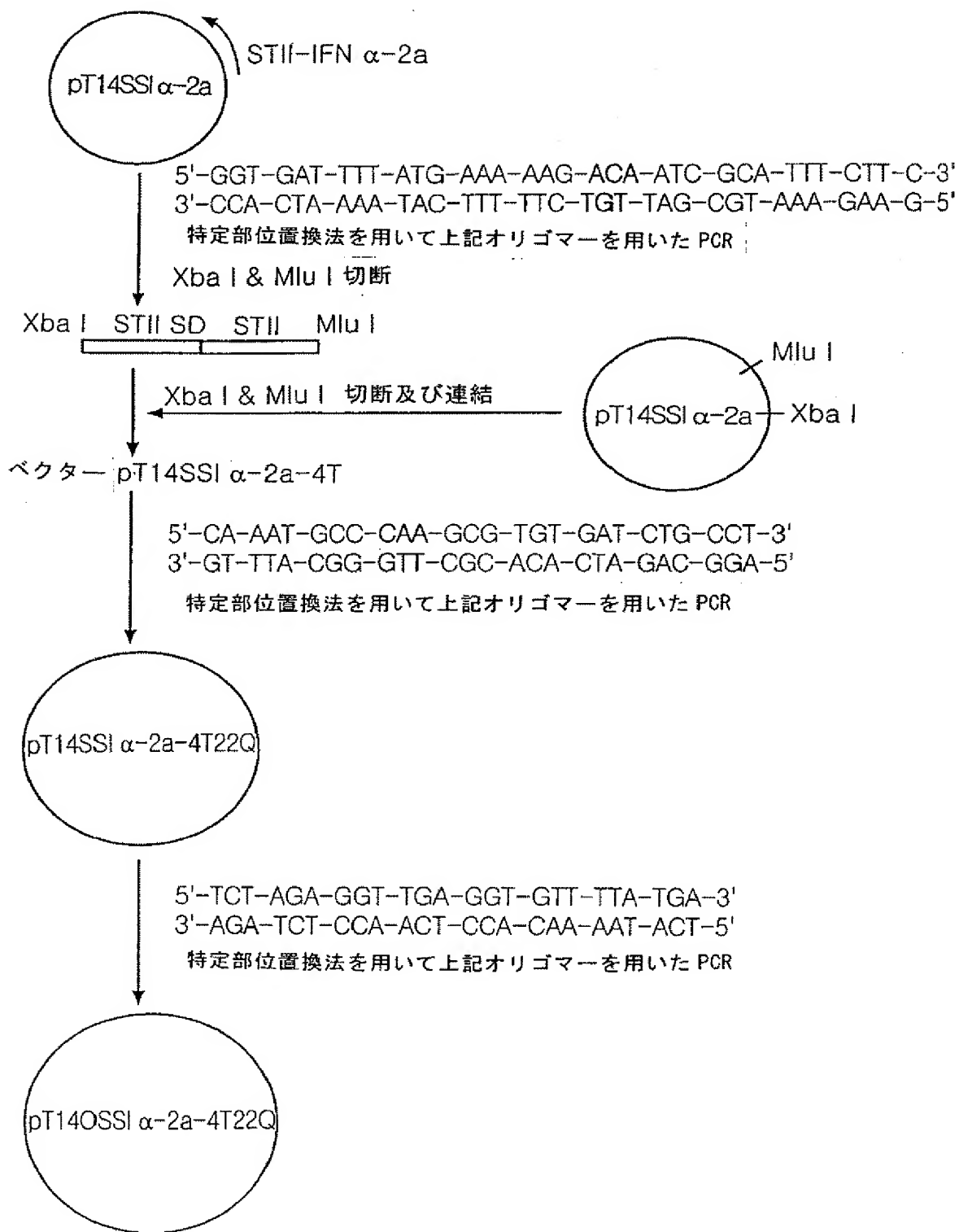
【図2】



【図3】



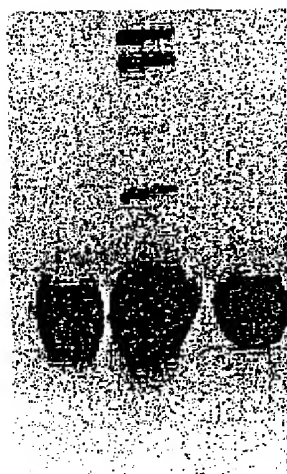
【図4】



【図5】

図 5A

1 2 3



← インターフェロン α

図 5B

1 2 3



← インターフェロン α

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR01/00097
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC7 C12N 15/21 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC7 C12N 15/70, 15/00; C12N 12/00; C12P 21/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Patents and applications for inventions since 1975 Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practicable, search terms used) IBM, PAJ, NCBI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,710,027 A (Boehringer Ingelheim International GmbH) 20 Jan, 1998 see the whole document	1, 3, 11, 13
Y	CHANG CN, REY M, BOCHNER B, HEYNEKER H & GREY G 'High-level secretion of human growth hormone by Escherichia coli' In: Gene, vol.55, no. 2-3, 1987, p189-196 see the whole document	4-6, 14-16
Y	SAIED AM, MAGNUSSEN NS, SRIANGANATHAN N, BURGER D & COSAND W 'Molecular homogeneity of heat-stable enterotoxins produced by bovine enterotoxigenic Escherichia coli' In: Infect. Immun., vol.45, no.1, 1984, p242-247 see the whole document	1, 2, 11, 12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reasons (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 MAY 2001 (11.05.2001)		Date of mailing of the international search report 14 MAY 2001 (14.05.2001)
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Facsimile No.		Authorized officer AHN, Mi-Chung Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR01/00097

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5710027A	20.01.1998	JP 7135992A2	30.05.1995
		EP 626448A3	14.01.1998
		DE 4329756A1	09.03.1995
		CN 1099799A	08.03.1995
		CA 2124271AA	27.11.1994

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1998)

フロントページの続き

- (72) 発明者 チョイ・キド
大韓民国135-243ソウル、ガンナムグ、ゲ
ボ3ドン、ゲボ・ジュゴン・アパートメン
ト601-407
- (72) 発明者 キム・チャソン
大韓民国449-840ギョングド、ヨンイン
シ、スジウプ、ポンドウクチョンリー・ナ
ンバー664番、ボンリム・アパートメント
106-903
- (72) 発明者 ベ・スンミン
大韓民国151-054ソウル、クワンナクグ、
ボンチョン4ドン・ナンバー1587-8番、
303
- (72) 発明者 リー・グワンスン
大韓民国138-160ソウル、ソンパグ、ガラ
クドン、ククドン・アパートメント2-
806
- Fターム(参考) 4B024 AA01 AA20 BA23 CA04 CA05
CA06 DA06 EA04 FA17 GA11
GA19 HA03 HA08 HA12
4B064 AG09 CA02 CA19 CC24 CE10
CE11 DA01
4B065 AA26X AA93Y AB01 AC14
AC15 BA02 CA24 CA44